高速分離ハイスループット (RRHT) カラムと ChromSword ソフトウェアを使用した Agilent 1200SL システムによるアルテミシニンの分析

アプリケーションノート

製薬

著者

William Long and Kenneth Lynam
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808
USA

Rodger Stringham
William J. Clinton Foundation
Hockessin, DE 19707
USA

Ahmed Aced
IRIS Technologies International, Ltd.
15984 South Clairborne Street
Olathe, KS 66062
USA

概要

アルテミシニンを分析する簡単なアイソクラテックメソッドを最低限の操作によって開発しました。最適な移動相を決定した後、複数の候補カラムから最適なカラムを選定しました。本調査では、分析カラムの選定作業を支援するツールとして、自動化プログラム、ChromSword ソフトウェアを使用しています。

メソッド開発を自動化した HPLC システムがあれば、分析にかかる工数を削減することができます。質量分析法などの強力な分析法を使用する場合であっても、シャープで十分に分離されたピークを出すことができれば、データの品質が高まり、分析作業が容易になります。本アプリケーションノートの例では、機器の稼働していない時間帯を利用して、完全に自動化された無人メソッド開発プログラムを 6 時間にわたって実行しました。

Agilent Technologies

はじめに

アルテミシニンは、クソニンジン (学名: Artemisia annua L.) に含まれる有効成分です。この植物の薬理効果は 2000 年以上前に中国で最初に発見され、中国では熱病やマラリアを含めたさまざまな病気の治療にこの植物が何世紀にもわたって利用されてきました。有効成分は 1971 年に初めて単離され、青蒿素あるいはアルテミシニンと命名されました [1]。以来、アルテミシニンとその誘導体は有効な抗マラリア剤として研究、使用されています。アルテミシニン自体はもはや使用されなくなっていますが、その代わりに、アルテミシニンよりも生物活性の高いアルテメテルやアルテスネートというアルテミシニンの誘導体が使用されるようになっています。アルテミシニンは各型の多剤耐性マラリアに対する有効性が実証された物質であるため、現在、その使用は世界保健機構のガイドラインに沿って厳重に管理されています [2、3]。

アルテミシニン化合物の構造および説明

アルテミシニンとその誘導体は、内部に二重酸素架橋を持つセスキテルペンラクトン類です。その抗マラリア作用の大部分は、この珍しい過酸化物架橋鎖に由来するものと考えられています。こうした化合物の構造を図 1 に示します。UV 吸収率の低い化合物であるため、低い UV 波長による検出で最も良い結果が得られます [4]。アルテミシニンは、いったんジヒドロアルテミシニン (DHA) に還元されてから、アルテメテルまたはアルテスネートに変換されます。体内では、これらの誘導体が、生理活性型である DHA に戻されます。複数のエピマー (ヒドロキシル基の付いた炭素の位置が異なる異性体) が混在した形で形成されることから、DHA の分析は複雑になります。アルテミシニン誘導体の合成反応および安定性をモニタリングするためには、こうした異性体を分離する必要があります。アルテミシニン、アルテスネート、および 2 つの DHA エピマーの分離を妥当な分析時間内に完了させることは極めて困難な作業です。

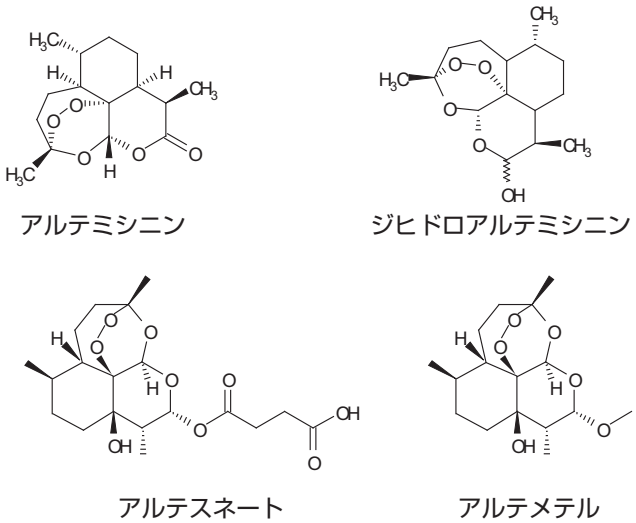

図 1.　アルテミシニン誘導体の構造

HPLC メソッドの最適化は、専門知識と時間の要求される作業です。メソッドを開発する際のよい方法は、標準的な開発手順に従うことです。標準的な開発手順の一例を示すと、次のようになります。まず、典型的な酸性、塩基性、および中性サンプルについて十分な保持力と分離能を確保するために高品質の C18 または C8 結合相を選択します。次に、多くのサンプルに使えそうなシンプルな移動相を選びます。どのような移動相を選ぶかは、使用する検出器によって異なります。質量分析計を使用する場合、最初に使用する移動相添加剤としてはギ酸が有力な候補になります。UV 検出器を使用する場合には、リン酸緩衝液や TFA から使い始めると良いでしょう。低い pH での酸性または塩基性化合物の分析には最適な移動相です。酸性化合物はプロトン化されて十分に保持され、塩基性化合物は良好なピーク形状で検出されます。有機修飾剤にはアセトニトリルかメタノールが使用できます。一般的には、UV 吸収率と粘度が低いという理由からアセトニトリルが選ばれます。移動相の有機成分含有率は、最適な選択性が得られるように変更します。必要な場合には他の結合相候補を調査してメソッドの完璧な最適化を図ることもできます。理想を言えば、どのピークについても分離能係数が 2 を超えるようにしたいところですが、このためには高効率カラムを使用する必要があります。また、最初のピークが少なくとも 1 カラムボリューム分 (k' = 1) は保持されるようにすることも重要です。これにより、最初のピークの保持が移動相の差異による影響を受けにくくなります。一般的には、20 分未満が望ましい分析時間です [5、6]。

ChromSword は、Agilent 1100 [7] または 1200 シリーズ HPLC システムに常駐してインタラクティブな機器制御を行うコンピュータプログラムです。このソフトウェアの使用/不使用にかかわらず、メソッドの開始ポイント (たとえば、カラム溶媒など) はユーザー自身が決定します。ただし、このソフトウェアを使用した場合には、それ以上のユーザー作業は不要になり、希望のメソッドが自動的に作成/ドキュメント化されることになります。

ChromSword Auto は、アジレントの共同研究パートナー、ChromSword Baltic 社によって開発されたプログラムです。このプログラムは、本調査で示した実験分析の他にも、完全自動化モードで動作してカラム/溶媒/温度の組み合わせをスクリーニングすることもできます。

実験

HPLC 分析には、次の構成の Agilent 1200 シリーズ Rapid Resolution LC (RRLC) システムを使用しました。

- G1312B バイナリポンプ SL + 移動相 A: 0.1% のギ酸水溶液、移動相 B: 0.1% のギ酸アセトニトリル溶液; 流量は 1 mL/min に設定
- G1376C オートサンプラ (ALS) SL
- G1316B 温度制御カラム (TCC) コンパートメント SL、温度は 25 °C

- G1316C ダイオードアレイ検出器 (DAD)、波長設定は 220,4 nm、リファレンス = オフ + G1315A-60024 セミマイクロフローセル (5 mm パス、6 µL ボリューム)
- 使用カラム: Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 4.6 mm × 100 mm、1.8 µm (部品番号 959964-902); ZORBAX Extend C18 4.6 mm × 100 mm、1.8 µm (部品番号 728975-902); ZORBAX StableBond SB-CN 4.6 mm × 100 mm、1.8 µm (部品番号 828975-905)

化学薬品類

18 MΩ 水は現場で調製。ギ酸およびアセトニトリルは Sigma Aldrich 社 (ペンシルバニア州ベルホンテ) から購入しました。アルテミシニン物質のサンプルはクリントン財団のご厚意により提供されたもの。

結果と検討

アイソクラテックメソッドを使用した自動メソッド開発は、以下の手順に従って行われます。分析者が、カラム (ZORBAX Eclipse Plus C18 4.6 mm × 100 mm、1.8 µm) と溶媒ペア (0.1% のギ酸水溶液と 0.1% のギ酸アセトニトリル溶液) を選択します。この移動相ペアを選択したのは、UV と MS 検出の両方に対応するためです。分析対象物から最良のピーク形状を引き出すために、単純な酸性移動相からメソッド開発を始めることが推奨されています。最初の分析は高い有機濃度で行われます。この初期実験では、有機含有率 80% の移動相でカラムを評価したのち、20 カラムボリュームに相当する量の 100% 有機移動相で洗浄が行われます。(所定の波長を使用して) ソフトウェアによって指定された分析対象物濃度 (このケースでは、ChromSword プログラムの既定値である 5,000 単位) でピークが検出されると、ChromSword は、HPLC システムに対して移動相の有機含有率を下げて同じ実験を実行するよう指示を出してピークの分離/検出を繰り返します。ChromSword は、実験分析が終了するたびに 100% 有機溶媒による洗浄を行って徐々に移動相の有機含有率を下げながら分離/検出を繰り返していくようシステムに指示を出します。それ以上ピークが検出されなくなるまで実験分析を繰り返し、その後、分析対象物濃度を下げて同じ分析を行い、それ以上ピークが検出されないことを確認します。ピークが存在しないことを確認すると、ChromSword はクロマトグラフィーシステムにこの分離の最適化を実行させます。このケースでは、12 回の実験が無人状態で 6 時間にわたって行われました。12 回の実験で得られたクロマトグラムを表 2 にまとめます。最終的な結果を図 3 に示します。図から分かる通り、分離能係数の最低値は 2.56 です。この実験分析に 6 時間しかかから

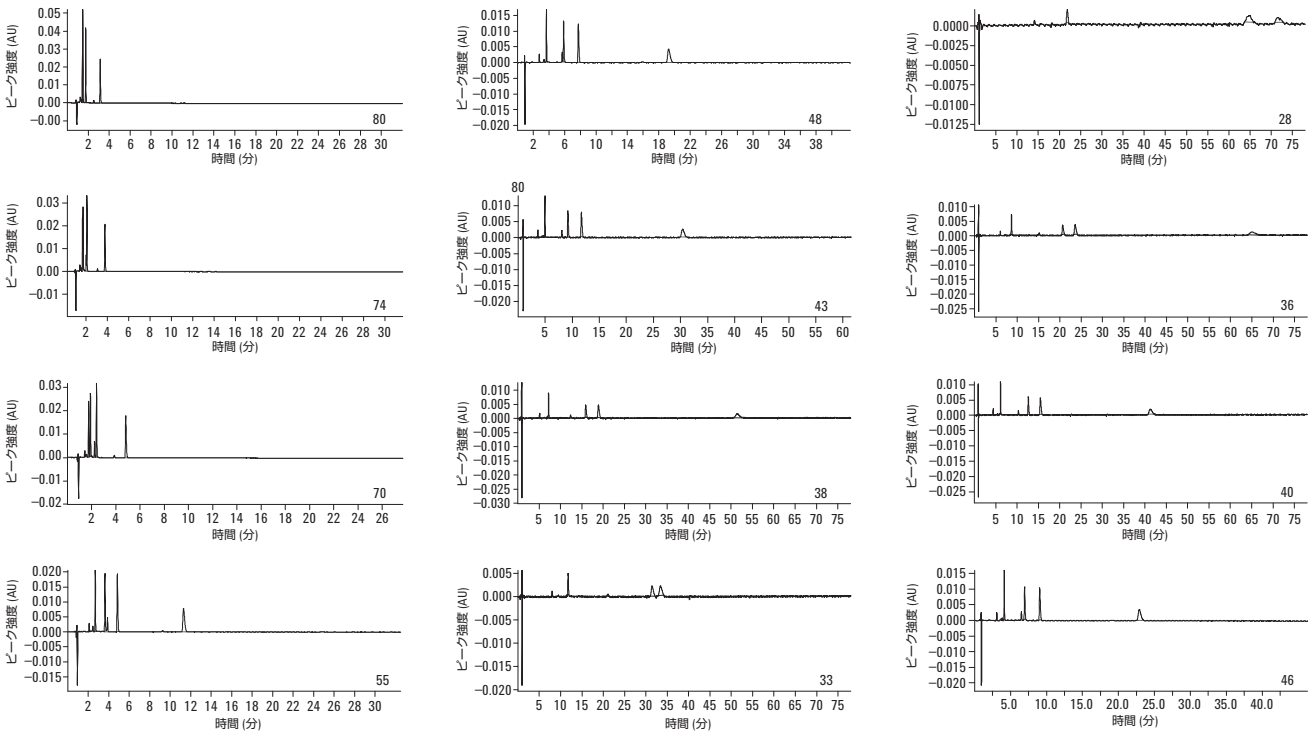

図 2. ChromSword Eclipse Plus C18 最適化実験: 4.6 X 100 mm 1.8 µm のカラム、アルテミシニン誘導体の混合液 (溶媒は 0.1% ギ酸水溶液と 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液)

なかったことを確認した上で、別のカラム (ZORBAX Extend C18 カラム、4.6 mm × 100 mm、1.8 µm) を評価しました。どちらの C18 カラムでも、ほぼ同じ分離能が得られ、溶出の早い化合物群が十分に分離された状態で最初に現れたのち、大きな間隔を開けて溶出の遅い化合物が現れるという同様の分離パターンが見られました。ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムでは、分離に要する時間が若干長くなりますが、2 と 3 のピーク形状は良くなります。この場合、経験豊かな分析者であれば、シアノカラムの使用が可能と判断するはずです。ここでは、ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムの最終実験で選んだ移動相を使用して ZORBAX StableBond SB-CN カラムを評価しました。この実験分析のクロマトグラムではメソッド開発の目標がすべて達成されているため、これ以上の最適化実験は行いませんでした。ZORBAX StableBond SB-CN カラムは、ほとんどのシアノ相が分離能を失うような苛酷な酸性条件下でも十分な耐用寿命を保持することが判明しました [8]。

結論

3 種類の RRHT カラムを使用した分離条件を開発し、各条件下での分離性能を詳しく調査しました。アセトニトリル/水/ギ酸という組成の移動相をアルテミシニン成分の分離に合わせて最適化しました。この結果、ZORBAX StableBond SB-CN 4.6 mm × 100 mm、1.8 µm カラムを使用したクロマトグラフ分析は 5 分未満で完了しました。このクロマトグラフ分析メソッドを開発するために、HPLC システムを無人状態で合計 12 時間稼働させました。自動メソッド開発プログラムを用いて作成した条件は、そのまま LC/MS 分析に使用することも、さらにメソッド開発を進める際の叩き台として使用することもできます。

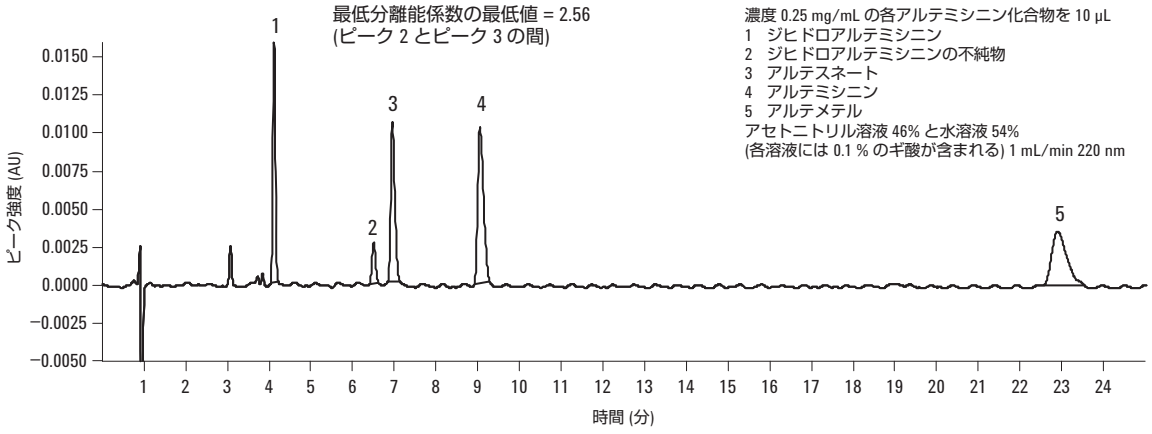

図 3. ChromSword によって作成された最終的なアルテミシニンのクロマトグラム (Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラムを使用した分析メソッド)

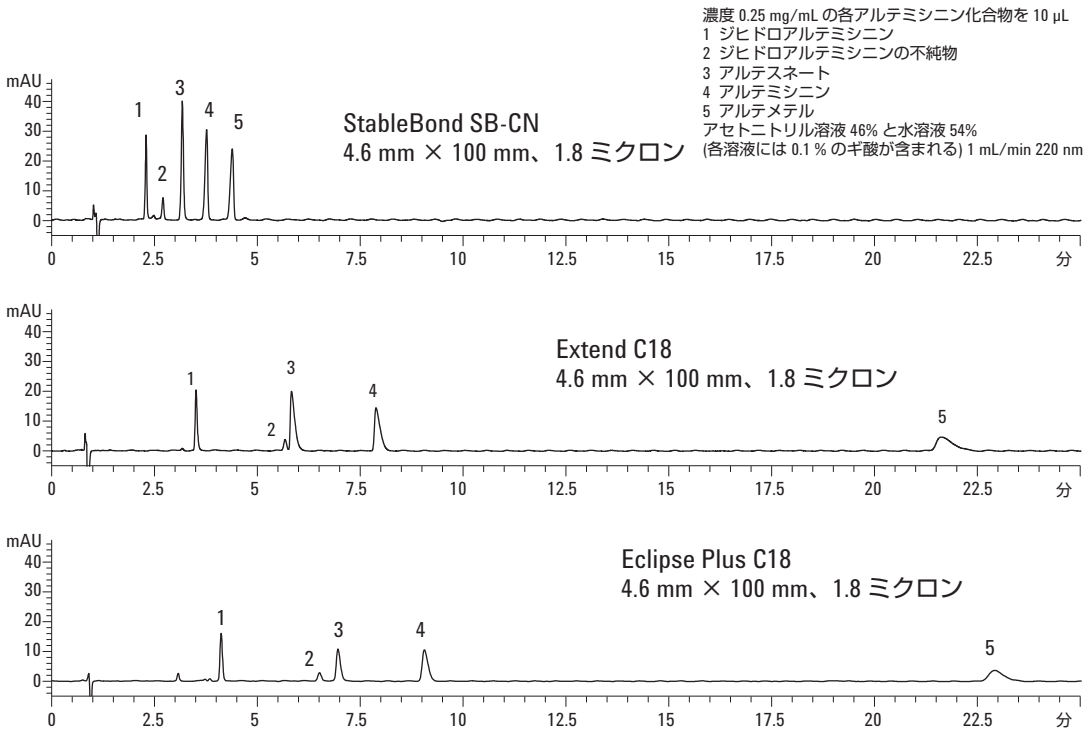

図 4.　3 種類のカラムによる分離の比較 (Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 カラム、ZORBAX Extend C18 カラム、ZORBAX StableBond SB-CN カラム)

参考文献

1. D. L. Klayman, "Qinghaosu (artemisinin): An Antimalarial Drug from China," Science, Vol. 228, Issue 4703, 1049–1055.
2. Artemisinin, http://en.wikipedia.org/wiki/Artemisinin
3. C. Rehwagen, "WHO Ultimatum on Artemisinin Monotherapy Is Showing Results," British Medical Journal 2006;332:1176 (20 May).
4. World Health Organization, “World Malaria Report 2008,” http://www.who.int/malaria/wmr2008/
5. メソッド開発ポスター、資料番号 5989-7282JAJP, August 2007.
6. L. R. Snyder, J. J. Kirkland, and J. L. Glajch, “Practical HPLC Method Development 2nd Edition,” John Wiley and Sons, (1997).
7. S. Galushko, R. Honsberg, A. Gratzfeld-Huesgen, and B. Hoffmann, "Automated Method Development Using Agilent 1100 Series HPLC Systems and ChromSword Software,” Agilent Technologies publication 5988-8927EN, 2004.
8. R. Ricker, “StableBond Family of Bonded Phases Designed for Optimum Lifetime at Low pH,” Agilent Technologies publication 5988-6457EN, April 2002.

詳細情報

アジレント製品とサービスの詳細については、アジレントのウェブサイト www.agilent.com/chem/jp をご覧ください。

www.agilent.com/chem/jp

アジレントは、本文書に誤りが発見された場合、また、本文書の使用により付随的または間接的に生じる損害について一切免責とさせていただきます。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

著作権法で許されている場合を除き、書面による事前の許可なく、本文書を複製、翻案、翻訳することは禁じられています。

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc., 2009
Published in Japan
March 4, 2009
5990-3617JAJP

Agilent Technologies